

# Деметилирование ретротранспозона LINE-1 ассоциировано с дестабилизацией атеросклеротических бляшек

Шарыш Д.В.<sup>1</sup>, Марков А.В.<sup>1</sup>, Слепцов А.А.<sup>1</sup>, Валиахметов Н.Р.<sup>1</sup>,  
Королева Ю.А.<sup>1</sup>, Казанцев А.Н.<sup>2</sup>, Барбараш О.Л.<sup>2</sup>, Назаренко М.С.<sup>1</sup>

1 — Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН  
6304050, г. Томск, ул. Набережная Ушайки, 10

2 — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

В работе проведен анализ уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в атеросклеротических бляшках сонных артерий, выделенных из них макрофагах и гладкомышечных клетках, а также в лейкоцитах периферической крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом и в лейкоцитах здоровых доноров. Выявлен сниженный уровень метилирования LINE-1 в атеросклеротических бляшках по сравнению с лейкоцитами крови пациентов, а также его связь с гистологическими признаками нестабильности атеросклеротической бляшки.

**Ключевые слова:** LINE-1, метилирование ДНК, атеросклероз

**Для цитирования:** Шарыш Д.В., Марков А.В., Слепцов А.А., Валиахметов Н.Р., Королева Ю.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Назаренко М.С. Деметилирование ретротранспозона LINE-1 ассоциировано с дестабилизацией атеросклеротических бляшек. *Медицинская генетика* 2020; 19(5): 50-51.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.05.50-51

**Автор для корреспонденции:** Шарыш Д.В., e-mail: sharysh.diana@gmail.com

**Финансирование.** Программа фундаментальных научных исследований РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 20.05.2020

## LINE-1 retrotransposon demethylation is associated to atherosclerotic plaques destabilization

Sharysh D.V.<sup>1</sup>, Markov A.V.<sup>1</sup>, Sleptcov A.A.<sup>1</sup>, Valiakhmetov N.R.<sup>1</sup>, Koroleva I.A.<sup>1</sup>,  
Kazantsev A.A.<sup>2</sup>, Barbarash O.L.<sup>2</sup>, Nazarenko M.S.<sup>1</sup>

1 — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences  
Naberezhnaya Ushaiki 10, Tomsk, 6304050, Russia

2 — Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases  
Sosnoviy blvd 6, Kemerovo, 650002, Russia

We analyzed the LINE-1 methylation level in carotid atherosclerotic plaques, macrophages and smooth muscle cells isolated from plaques and in the blood leukocytes of patients with clinically significant atherosclerosis and leukocytes of healthy donors. A reduced level of LINE-1 methylation in atherosclerotic plaques was detected compared to leukocytes, as well as it was associated with the histological features of carotid plaque instability.

**Keywords:** LINE-1, DNA methylation, atherosclerosis

**For citation:** Sharysh D.V., Markov A.V., Sleptcov A.A., Valiakhmetov N.R., Koroleva I.A., Kazantsev A.A., Barbarash O.L., Nazarenko M.S. LINE-1 retrotransposon demethylation is associated to atherosclerotic plaques destabilization. *Medical genetics*. 2020; 19(5): 50-51. (In Rus)

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.05.50-51

**Corresponding author:** Sharysh D.V., e-mail sharysh.diana@gmail.com

**Funding.** Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, the Program for basic scientific research.

**Conflicts of interest.** The authors declare no conflict of interests.

**Accepted:** 20.05.2020

Большая доля всех метилированных CpG-сайтов генома приходится на повторяющиеся генетические элементы, такие как ретротранспозоны LINE, при этом доля LINE-1 в геноме составляет 17%, поэтому уровень метилирования этого элемента отражает уровень глобального метилирования ДНК. В не-

давнем исследовании De Cecco M. et al. (2019) установлено, что ретротранспозон LINE-1 активируется в геноме различных клеток у пожилых людей, что может способствовать воспалению путем индукции синтеза интерферонов [1]. Известно, что атерогенез характеризуется снижением уровня метилирования LINE-1

в атеросклеротически пораженных артериях [2]. Риск развития острых сосудистых событий также связан со снижением уровня метилирования LINE-1 в лейкоцитах крови индивидов [3]. Клинические проявления данного заболевания, как правило, развиваются на поздних стадиях патологического процесса, когда повреждения атеросклеротической бляшки приводят к острым сердечно-сосудистым событиям. В связи с недостатком знаний о связи метилирования LINE-1 со стабильностью атеросклеротических бляшек сонных артерий (САБ), исследование статуса метилирования ретротранспозона LINE-1 является актуальной задачей в изучении молекулярных основ атерогенеза.

**Цель и задачи исследования** – выявление особенностей уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках сонных артерий (макрофагах и гладкомышечных клетках) и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом, а также в лейкоцитах крови здоровых индивидов; анализ связи уровня метилирования LINE-1 в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови пациентов с гистологическими параметрами атеросклеротических бляшек.

### Материалы и методы

Для работы сформирована выборка из 63 пациентов ( $64,6 \pm 7,3$  лет, 38 мужчин и 25 женщин) со стенозом сонных артерий  $>70\%$ , у которых во время хирургического вмешательства были взяты лейкоциты крови (ЛК) и образец САБ. В контрольную группу вошел 71 здоровый индивид (48 мужчин и 23 женщины) сравнимого возраста и со стенозом сонных артерий не более  $15\%$ , у которых были взяты ЛК. Некоторые образцы САБ ( $n=14$  из 63) сразу после операции разделены на две эквивалентные части: одна часть использовалась для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания и последующей изоляции клеток методом лазерной микродиссекции, а другая – для молекулярно-генетического анализа. Атеросклеротические бляшки классифицированы по стадиям в соответствии с классификацией American Heart Association, а степень их стабильности определялась согласно критериям Lovett J. K [4]. Иммуногистохимические препараты приготовлены с окраской гладкомышечных клеток (ГМК) (a-SMA+) и макрофагов (CD68+). Методом лазерной микродиссекции из ИГХ-микротрепаратов вырезаны таргетные клетки, по 1000 каждого типа. После выделения и бисульфитной конверсии ДНК из образцов крови, цельных САБ и диссектированных клеток была проведена амплификация участка LINE-1 и оценен уровень метилирования 3 CpG-сайтов в позициях 318, 321, 328 последовательности GenBank X58075 (CpG1-3) набором PyroMark Q24 CpG LINE-1 (Qiagen). Сравнение групп по уровню метилирования LINE-1 проводилось с помощью критерия Манна-Уитни.

### Результаты

Уровень метилирования LINE-1 в САБ ( $56,7\%$  [ $53,6\%–59,7\%$ ]) был немного ниже, чем в ЛК ( $57,5\%$  [ $55,4\%–67,3\%$ ];  $p=0,02$ ) тех же пациентов. Между группами ЛК пациентов и здоровых индивидов статистически значимых различий не было. Кроме того, уровень метилирования LINE-1 в САБ на поздних стадиях (IV–VII тип;  $55\%$  [ $53\%–59\%$ ]) был ниже по сравнению с ранними стадиями (I–III тип;  $57\%$  [ $56\%–60\%$ ];  $p=0,049$ ). Снижение уровня метилирования CpG-сайтов LINE-1 на 2-3% обнаружено в САБ и ЛК при неоваскуляризации САБ, в ЛК – при наличии повреждений покрывки и в САБ – при наличии очагов кальцинации. Усредненные уровни метилирования LINE-1 в ГМК ( $65,6\%$  [ $63,2\%–67,4\%$ ]) и макрофагах ( $78,4$  и  $69,0\%$ ) были выше таковых в САБ ( $57,3\%$  [ $56,8\%–59,2\%$ ]) и клетках крови ( $60,6\%$  [ $59,3\%–61,0\%$ ]).

Из литературных источников известно, что обработка культур ГМК гомоцистеином, известным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, приводит к снижению метилирования LINE-1 на  $10\%$ , с  $75\%$  до  $65\%$  [5], что соответствует уровню метилирования в ГМК из САБ, установленному в настоящем исследовании. Вероятно, в САБ существуют клетки с более низким уровнем метилирования LINE-1, чем в ГМК и макрофагах. Таким образом, уровень метилирования LINE-1, по-видимому, является неспецифическим эпигенетическим маркером атеросклероза.

### Выводы

Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 снижается в САБ по сравнению с ЛК пациентов с атеросклеротическим поражением артерий. Наличие гистологических признаков дестабилизации САБ ассоциировано с более низким уровнем метилирования LINE-1 не только в САБ, но и в ЛК. Уровни метилирования данного элемента в ГМК и макрофагах, выделенных из САБ, выше, чем в цельных тканях.

### Литература/ References

1. De Cecco M. et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* 2019; (7742): 73–78.
2. Greissel A. et al. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thrombosis and haemostasis* 2015; (114): 390–402.
3. Baccarelli A. et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology* 2010; (21): 819.
4. Lovett J. K. et al. Histological correlates of carotid plaque surface morphology on lumen contrast imaging. *Circulation* 2004; (110): 2190–2197.
5. Yideng J. et al. Homocysteine-mediated expression of SAHN, DNMTs, MBD2, and DNA hypomethylation potential pathogenic mechanism in VSMCs. *DNA and cell biology* 2007; (26): 611